

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

WIPO

PCT



EP 01/1163

EJU

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

100 08 594.6

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**Anmeldetag:**

22. Februar 2000

Anmelder/Inhaber:

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena/DE

Bezeichnung:Verfahren und Anordnung zur Detektion des von
einer Probe kommenden Lichtes**IPC:**

G 01 J, G 01 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**München, den 21. November 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Vizepräsident

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) mit ihrer Lokalisierung in einem Mikroskopaufbau (FCM) bewährt sich insbesondere dort zur Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen, wo die Untersuchungen in sehr geringen Konzentrationsbereichen kleiner $1\mu\text{Mol}$ und in Meßvolumina kleiner 10^{-14} l stattfinden¹. Solange die zu untersuchenden Proben homogen sind, spielt der Meßort nur eine untergeordnete Rolle. Im Falle von strukturierten Proben wie zum Beispiel biologischen Zellen, ist die Kenntnis bzw. die Auswahl des Meßortes aber von entscheidender Bedeutung. Diese Kenntnis über den Meßort wurde bisher über klassische Durchlicht- bzw. Auflicht-Mikroskopie gewonnen. Dazu wurde z.B. zwischen der FCS-Detektionseinheit und einer klassischen Fluoreszenzmikroskopanordnung umgeschaltet. Die Anwendung der klassischen Mikroskopie hat mehrere Nachteile. Einerseits werden dabei die Proben einer hohen Strahlungsbelastung ausgesetzt, andererseits kann der optimale Meßort im dreidimensionalen Koordinatensystem nicht mit der erforderlichen Präzision von weniger $1\mu\text{m}$ lokalisiert werden.

Die in den Patentansprüchen sowie anhand der bildlichen Darstellungen unten beschriebene Einrichtungen und Verfahren ermöglichen vorteilhaft die Erweiterung der FCS Methode zu einem bildgebenden Verfahren (S-FCM). Damit können Aussagen zur räumlichen Verteilung der zu untersuchenden molekularen Wechselwirkungen gewonnen werden.

In Bild 1 ist eine erste vorteilhafte Anordnung dargestellt.

Mit einer Mikroskopeinheit MU (hier ein inverses Mikroskop zur Beobachtung einer auf einem in x-, y- und z-Richtung verstellbaren Tisch T befindlichen Probe P über ein unterhalb der Probe angeordnetes Objektiv O und eine Tubuslinse TL) wird mit Hilfe einer Scaneinheit SU Licht aus einer Laserlichtquelle LLS mit einer oder mehreren Wellenlängen direkt oder durch eine Lichtleitfaser LF über eine Kollimationsoptik KO sowie einem primären Strahlteiler STPS in eine Probe fokussiert. Der Scanner S erlaubt das Ablenken des Lichtstrahles in x- und y-Richtung, die Erfassung unterschiedlicher Probenschichten kann durch die vertikale Verstellung des Probentisches T oder des Objektivs O erfolgen. Das von der Probe kommende Licht durchläuft wieder den Scanner S und wird mittels der sekundären Strahlteiler STSS 1...N den Detektionskanälen DES1...N zugeordnet und in elektrische Signale zur Auswertung über eine Kontrolleinheit CU in einem Computer C umgewandelt. Die

gemessenen Signale werden zur Gewinnung von Bildinformationen genutzt. Mit Hilfe einer Strahlumschaltungseinheit BS, beispielsweise eines ein- und ausschwenbaren Vollspiegels oder teildurchlässigen Spiegels wird Licht LLF aus einer Laserlichtquelle mit einer oder mehreren Wellenlängen mit Hilfe einer FCS-Einheit FU über einen primären Strahlteiler STPF in die Probe fokussiert.

Die Lichtquellen LLS und LLF können auch identisch sein und über geeignete Umlenk- und Schaltelemente in die Einheiten SU bzw. FU eingekoppelt werden.

Das von der Probe kommende Fluoreszenzlicht wird durch sekundäre Strahlteiler STSF 1...N in einen oder mehrere FCS-Detektionskanäle DEF 1... N geleitet und zur Auswertung in elektrische Signale umgewandelt und der Kontrolleinheit CU übermittelt. Die Signale werden zur FCS-Analyse verwendet.

Je nach Anzahl der installierten Detektionskanäle kann es sich um Auto-oder Kreuzkorrelationsanalysen handeln.

Hierbei werden am aktuellen Probenort beispielsweise Diffusionszeiten, Teilchenzahlen, Lebensdauern, Anteile von Komponenten ermittelt.

Die Datenaquise wird für beide Detektionseinheiten von der gleichen Kontrolleinheit CU und einem Computer C mit geeignetem Programm gesteuert. Ebenso erfolgt die Steuerung des Probenstisches T, der vertikalen Objektiveinstellung des Objektives O und der Strahlumschaltungseinheit BS durch diese computergesteuerte Kontrolleinheit. Durch die Integration einer FCS-Detektionseinheit in ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop-System ergibt sich somit die Möglichkeit, auch FCS-Analyseergebnisse von Messungen an verschiedenen Probenorten zu einem bildhaften Ergebnis zu kombinieren. Dadurch ergibt sich eine vorteilhafte Anordnung, die geeignet ist, FCS-Meßorte probenschonend mit hoher Genauigkeit festzulegen und andererseits auch FCS-Analyseergebnisse von Messungen an verschiedenen Orten zur Bildgebung zu verwenden.

Beispielsweise ist es vorteilhaft möglich, über unterschiedliche Farbgebung eine farbige flächenhafte oder räumliche Darstellung der Diffusionszeiten oder anderer Analyseergebnisse in Abhängigkeit vom Meßort zu erzeugen.

Weiterhin kann durch speichermäßige Zuordnung das aufgenommene FCS Bild beispielsweise als Zusatzfarbe bildlich mit kanalweise andersfarbigen LSM-Bildern verknüpft werden.

Es können auch FCS/LSI-Differenz- oder Quotientenbilder oder anderweitige Kombinationen gebildet und dargestellt werden.

Die erfindungsgemäße Modifikation des Laser-Scanning-Mikroskopes und die wirkungsmäßige Verbindung mit der FCS-Geräteeinheit erfolgt durch geeignete Programme im Computer mittels einer für alle Komponenten gemeinsamen Gerätesteuerereinheit. Scaneinheit, FCS-Einheit, Mikroskopeinheit und Probenpositionssystem sind mechanisch, optisch und elektronisch aufeinander abgestimmt und verkoppelt.

Nach dem Scannen der Probe können Bildpunkte markiert und in die Meßposition für die FCS-Einheit gebracht und vermessen werden.

Die Auswahl der interessierenden Punkte kann automatisch nach vorgegebenen Kriterien (z.B. Raster, Struktur Erfassung des Bildes) oder durch den Benutzer nach individueller Bewertung des mit der Scaneinheit aufgenommenen Bildes erfolgen.

Der vorgeschlagene Aufbau ermöglicht die gezielte Auswahl mikroskopisch kleiner Meßorte in der mit der FCS-Methode zu untersuchenden Probe. Außerdem ist es möglich, aus einer systematischen Folge von FCS-Messungen die räumliche Variation der FCS-Analyseergebnisse bildhaft zu erfassen, darzustellen und dem LSM-Bild zuzuordnen.

In Bild 2 ist eine weitere vorteilhafte Anordnung dargestellt.

Hier ist an/in einer gemeinsamen Einheit SFU eine gemeinsame Lasereinheit LLSF vorgesehen sowie ein gemeinsamer Primärstrahlteiler STPFS. Dargestellt sind separate Strahlteiler und Detektoren DEF, STSF und DES, STSS für die LSM- und FCS-Detektion. Vorteilhaft können die Detektoren DEF und DES baugleich sein. Der Meß- und Auswertemodus kann mittels der Kontrolleinheit CU gewählt werden.

Die vorteilhafte Anordnung ergibt sich durch die gemeinsame Lokalisation der LSM- und der FCS-Detektionskanälen in einer Einheit. Ähnlich dem Aufbau, der in Bild 1 beschrieben wurde, wird Laserlicht einer oder mehrerer Wellenlängen mit Hilfe einer Kollimationsoptik und des primären Strahlteilers durch eine Scaneinheit in die Probe fokussiert. Ein besonderer Vorteil dieses Aufbaus ist, daß auch der Meßort für die FCS-Messung mit Hilfe der Scanner gewählt werden kann. Insbesondere ist es dadurch möglich, die FCS-Analysenmethode zu einem bildgebenden Verfahren (Scanning FCM: S-FCSM) vorteilhaft zu erweitern. Reflektiertes Licht und Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv aufgefangen, durchläuft wiederum die Scanner und wird von einem oder mehreren sekundären Strahlteilern in einen oder mehrere LSM-Detektionskanäle oder FCS-Detektionskanäle umgeleitet. Dabei kann eine Trennung nach spektralen Eigenschaften oder Polarisations-eigenschaften erfolgen. Das detektierte Licht induziert elektrische Signale die zur Kontrolleinheit mit angeschlossenem Computer nebst geeignetem Programm geleitet und dort zur FCS-Analyse bzw. zur Bildrekonstruktion verwendet werden.

Das Laser-Scanning-Mikroskop ist hier so modifiziert, daß es Komponenten und Auswerteverfahren enthält, die es erlauben, auch FCS-Messungen durchzuführen.

Scankomponenten und FCS-Komponenten sind erfindungsgemäß so kombiniert, daß eine Strahlteilung bzw. Strahlumschaltung, wie sie im Bild 1 dargestellt wurde, entfallen kann. Der Vorteil dieser Anordnung besteht darin, daß zur Durchführung der FCS-Analysen an den vorher ausgewählten Punkten keine Probenbewegungen mehr erforderlich sind, da der Meßort mit Hilfe der Scanner und durch vertikale Verstellung des Objektivs eingestellt werden kann.

Die wirkungsmäßige Verbindung der Betriebsmodi erfolgt, indem entweder direkt während des Scanvorganges der Scanner angehalten wird und an dem hierdurch eingestellten Probenpunkte eine FCS-Auswertung verfolgt oder nach dem Scanvor-

gang durch Einstellen des Spiegel oder Verstellen des Teleskops bei stehenden Scannerspiegeln an bestimmten Punkten eine FCS Auswertung erfolgt

Durch die Anordnung gemäß Bild 2 sind FCS-Messungen mit hoher Positioniergenauigkeit in kürzerer Folge möglich. Dieser vorgeschlagene Aufbau stellt ein scannendes Fluoreszenz-Korrelations-Mikroskop (S-FCM) dar, welches erfindungsgemäß sowohl strukturelle als auch biochemische Informationen bildhaft darstellen kann.

Patentansprüche

1.

Einrichtung zur Detektion von Fluoreszenzlicht mit wenigstens einer bildgebenden Mikroskopeinheit und wenigstens einer Gerätekomponeute zur Analyse molekularer Wechselwirkungen in kleinen Volumina, gekennzeichnet dadurch, daß

- Meßorte für die Analyse molekularer Wechselwirkung mit Hilfe des bildgebenden Verfahrens mindestens zweidimensional bestimmt und ausgewählt werden
- sowohl die bildgebende Mikroskopeinheit als auch die Gerätekomponeute mit einer gemeinsamen Steuereinheit betrieben werden,
- und über die Steuereinheit und einen Computer mindestens die Analysenergebnisse der Gerätekomponeute bildhaft dargestellt werden.

2. Einrichtung nach Anspruch 1, wobei die Analysenergebnisse dem Bild der bildgebenden Mikroskopeinheit zugeordnet werden.

3..

Einrichtung nach Anspruch 1 oder 2 wobei die Analyse molekularer Wechselwirkungen mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) erfolgt und die Einheit zur Bildgebung auf dem Prinzip der Laser-Scanning-Mikroskopie beruht.

4.

Einrichtung nach einem der Ansprüche 1-3 wobei die Auswahl des Probenortes für die FCS-Messung mit Hilfe eines verfahrbaren Probenstisches und/oder vertikaler Verstellung des Objektives manuell und/ oder automatisch erfolgt

5.

Einrichtung nach einem der Ansprüche 1-4, wobei die Auswahl des Probenortes manuell und/ oder automatisch für die FCS-Messung mit Hilfe von mindestens einem Scanner erfolgt.

6.

Einrichtung zur Detektion des von einer beleuchteten Probe kommenden Lichtes, insbesondere nach einem der Ansprüche 1-5 bestehend aus einem Laser- Sanning- Mikroskop (LSM) und einer in den Beleuchtungstrahlengang des LSM zwischen dem Scanner des LSM und der Probe eingekoppelten Anordnung zur Anregung und Erfassung von FCS über eine gemeinsame Auswerteeinheit.

7.

Einrichtung zur Detektion des von einer beleuchteten Probe kommenden Lichtes, insbesondere nach einem der Ansprüche 1-5, bestehend aus einem Laser- Sanning- Mikroskop (LSM), wobei dem Scanner des LSM in Richtung der Detektion neben den LSM- Detektoren weitere Detektoren zur Erfassung von FCS - Signalen nachgeordnet sind und/ oder die Betriebsweise der LSM Detektoren von einer gemeinsamen Steuereinheit auf FCS Auswertung umgeschaltet wird. .

8.

Verfahren zur Detektion des von einer beleuchteten Probe kommenden Lichtes, insbesondere nach einem der Ansprüche 1-7 , wobei die Probe punktweise mindestens zweidimensional mit Beleuchtungslicht abgescannt und das von der Probe kommende Licht über mindestens einen ersten Detektor detektiert wird und während des Scanvorganges und / oder nach dem Scanvorgang für mindestens einen Probenpunkt eine FCS - Auswertung erfolgt

9.

Verfahren nach Anspruch 8 wobei für mindestens einen Probenpunkt eine Abspeicherung und speichermäßige Zuordnung sowohl des beim Scannen detektierten Wertes als mindestens eines bei der FCS-Auswertung detektierten Wertes erfolgt.

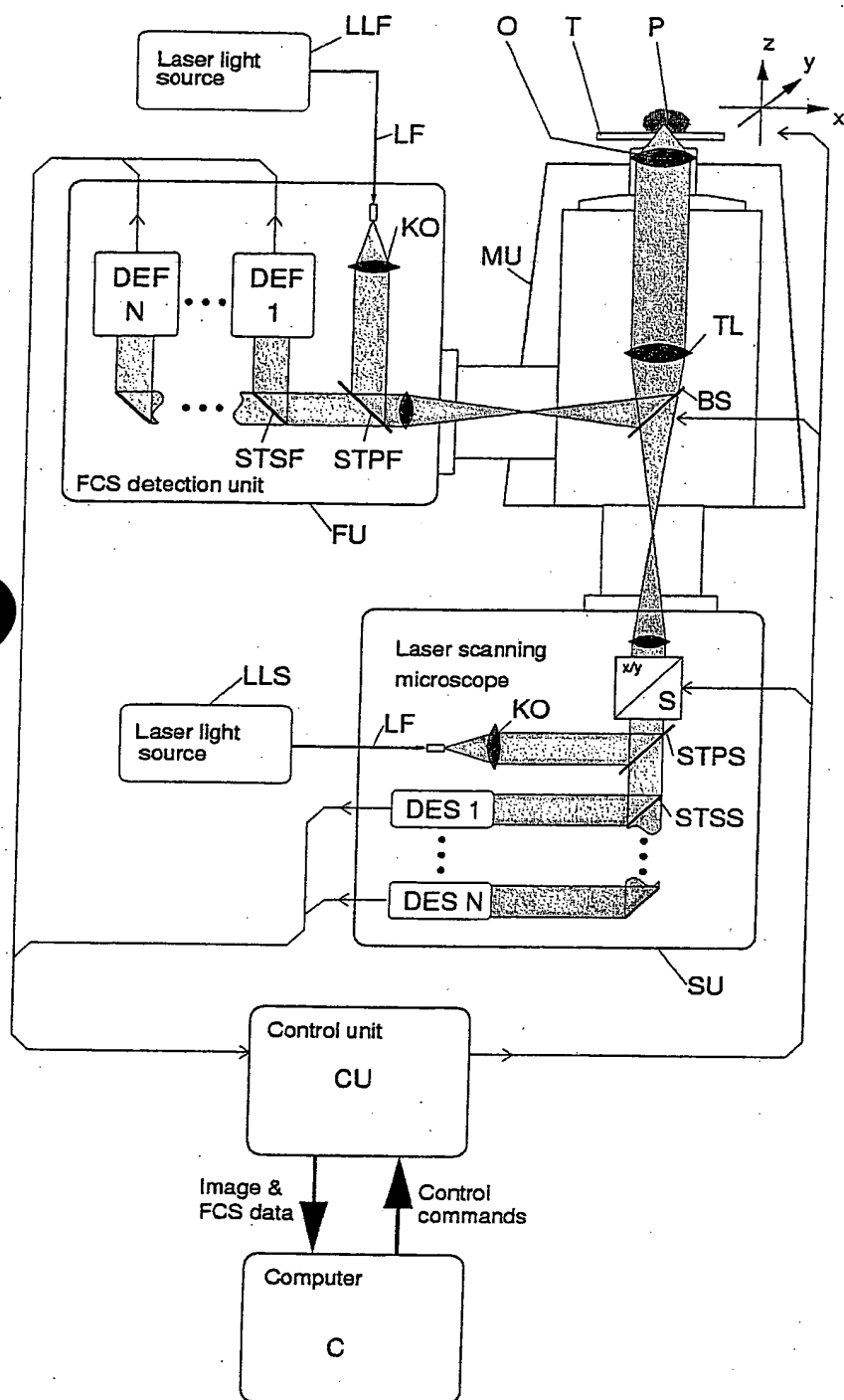
10.

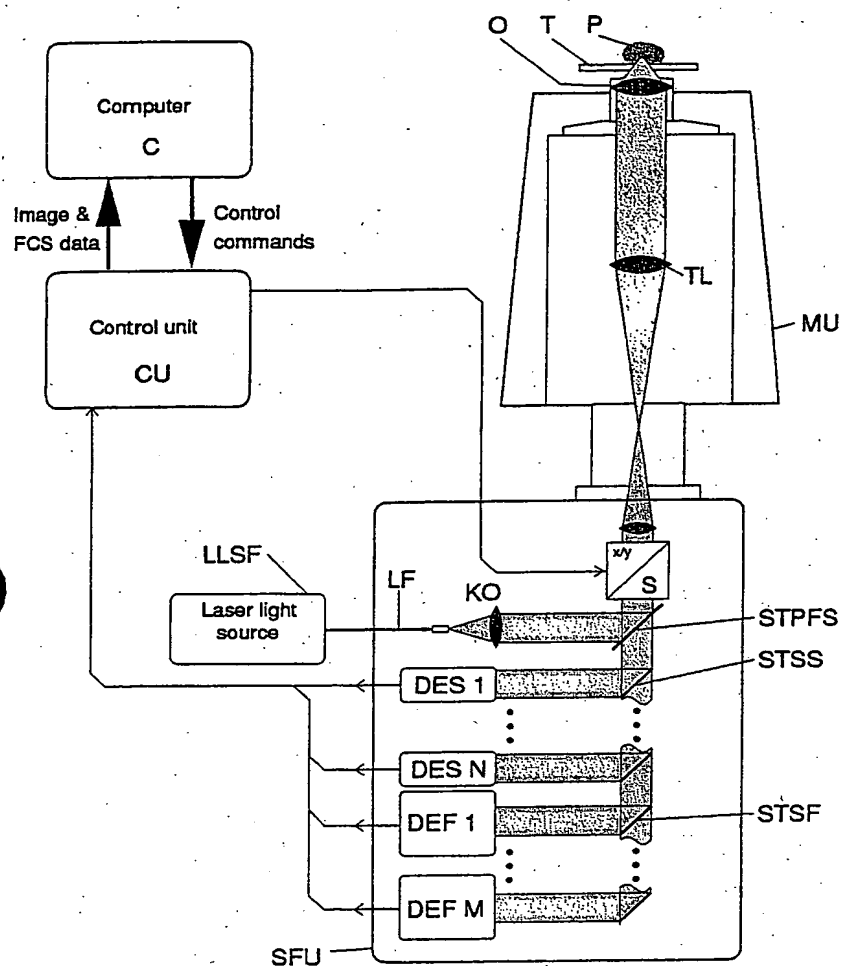
Verfahren nach Anspruch 8 oder 9 wobei die obenstehenden Verfahrensschritte für mehrere automatisch und/ oder manuell vorgewählte Probenpunkte erfolgen

11.

Verfahren nach einem der Ansprüche 8-10, wobei Mittel zur gemeinsamen bildlichen Darstellung der beim Scannen und bei der FCS-Auswertung ermittelten Werte vorgesehen sind.

Bild 1





THIS PAGE BLANK (USPTO)